

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/10, H01F 1/00, 1/11, C09C 3/06, C04B 35/628	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/32762 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juni 2000 (08.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08996		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. November 1999 (23.11.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 55 259.9 30. November 1998 (30.11.98) DE 198 54 973.3 30. November 1998 (30.11.98) DE		(Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>)
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): HARTTIG, Herbert [DE/DE]; Feuerbachstrasse 11, D-67122 Altrip (DE). RIEDLING, Michael [DE/DE]; Albert-Wesberger-Allee 71, D-66386 St. Ingbert (DE). MENNIG, Martin [DE/DE]; Mittelstrasse 5, D-66287 Quierschied (DE). SCHMIDT, Helmut [DE/DE]; Im Königsfeld 29, D-66130 Saarbrücken-Güdingen (DE).		
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		

(54) Title: MAGNETIC PARTICLES FOR PURIFYING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: MAGNETISCHE PARTIKEL ZUR REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN

(57) Abstract

The invention relates to preparations of particles having a glass surface. More than 75 wt.-% of said particles have a grain size of between 0.5 and 15 µm and have a glass surface which contains between 2 to 6 mole-% zinc oxide. The inventive particles are especially useful for purifying nucleic acids; particularly, an increased nucleic acid yield is achieved.

(57) Zusammenfassung

Zubereitungen von Partikeln mit einer Glasoberfläche, wobei mehr als 75 Gew.-% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 0.5 µm und 15 µm haben sowie mit einer Glasoberfläche, welche einen Anteil von zwischen 2 und 6 mol-% Zinkoxid enthält, haben sich als besonders vorteilhaft in Nukleinsäurerereinigungsverfahren erwiesen. Insbesondere wird eine erhöhte Nukleinsäureausbeute erreicht.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

MAGNETISCHE PARTIKEL ZUR REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN

Gegenstand der Anmeldung ist eine Zubereitung von Partikeln mit einer Glasoberfläche, ein Verfahren zur Herstellung einer solchen Zubereitung sowie ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren mit Hilfe dieser Zubereitung.

Nukleinsäuren sind in jüngerer Zeit immer mehr in den Blickpunkt des Interesses der medizinischen Diagnostik gerückt. So wurden mittlerweile eine Vielzahl von Nachweisverfahren erarbeitet, bei denen die Anwesenheit oder Abwesenheit bestimmter Nukleinsäuren als Anzeichen für eine Erkrankung bewertet wird. Hierzu gehören z. B. Nachweise infektiöser Organismen, z. B. von Viren oder Bakterien in Körperflüssigkeiten, aber auch der Nachweis von Mutationen in genomischen Nukleinsäuren, z. B. in der Onkologie. Nukleinsäuren liegen in dem üblicherweise verwendeten Probenmaterial jedoch in sehr geringen Konzentrationen vor. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verfahren zur Isolierung der Nukleinsäuren von anderen Probenbestandteilen, wie Proteinen oder anderen zellulären Bestandteilen, die teilweise die anschließenden Nachweisverfahren stören, erarbeitet. Ein Teil dieser Verfahren verwendet festphasengebundene Fangsonden, die mit den abzutrennenden Nukleinsäuren hybridisieren können und diese an der Festphase zurückhalten, während die übrigen Probenbestandteile entfernt werden. Ein solches Verfahren ist beispielsweise in EP-B-0 305 399 beschrieben. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß sie sich jeweils nur für die Reinigung von Nukleinsäuren mit einer ganz speziellen Nukleotidsequenz eignen.

In WO 91/12079 ist ein Verfahren für die Isolierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Magnetpartikeln aus Zellulose und Eisenoxid beschrieben, wobei die Partikelgröße mit zwischen 1 und 10 µm angegeben ist. Diese Partikel enthalten keine Glasoberfläche und sind nur für eine Isolierung unter Präzipitation von Nukleinsäuren geeignet. Durch Aggregation werden jedoch eine Vielzahl von Probenbestandteilen eingeschlossen, die spätere Verfahrensschritte stören.

In EP-B-0389 063 wird ein Verfahren vorgeschlagen, bei dem die Probe mit einem Gemisch eines chaotropen Guanidiniumsalzes und Silicapartikeln gemischt wird. Unter diesen Bedingungen binden Nukleinsäuren relativ sequenzunabhängig an die Silica-Oberfläche. Die übrigen Probenbestandteile können abgewaschen und die Nukleinsäuren anschließend eluiert werden.

In WO 96/41811 werden magnetische Partikel mit einer im wesentlichen porenfreien Glasoberfläche zur sequenzunabhängigen Reinigung von Nukleinsäuren beschrieben. Die dort verwendeten Partikel haben einen Kern, bevorzugt mit Magnetit als magnetischem Werkstoff und haben eine bevorzugte Korngröße von zwischen 10 und 60 µm. Magnetit in Kristallen größer ca. 30 bis 50 nm zeigt hartmagnetische Eigenschaften. Durch ein externes Magnetfeld wird permanenter Magnetismus induziert. Partikel mit solchen hartmagnetischen Kernen zeigen nach dem ersten Einwirken eines externen magnetischen Feldes die Eigenschaften eines kleinen Permanentmagneten. In Suspension ziehen sich solche Partikel gegenseitig an und bilden größere Einheiten. Diese größeren Einheiten sedimentieren unter dem Einfluß eines äußeren Schwefeldes schneller, als die Partikel als Einzelne. Das ist nachteilig, da länger andauernde Inkubationen häufiges Redispersieren erfordern.

In WO 96/41840 werden Pigmente beschrieben, die eine Glasoberfläche einer Dicke von mindestens 0,8 µm aufweisen. Als eine glasbildende Komponente werden auch Verbindungen von Zink vorgeschlagen. Es entstehen dabei Pigmentpartikel mit einer Teilchengröße von vorzugsweise 2 bis 20 µm.

Es hat sich nun herausgestellt, daß bei den bisher beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Partikeln nach dem Sol-Gel-Prozeß, bei dem Kernpartikel einer vorgegebenen Größe mit einem Gel beschichtet werden und anschließend eine Verdichtung zu einer Glasoberfläche stattfindet, ein hoher Anteil von Partikeln gebildet wird, die kein Kernpartikel enthalten. Dies führt entweder dazu, daß bei mit solchen Zubereitungen durchgeführten Nukleinsäurenachweisverfahren große Verluste an Nukleinsäuren stattfinden oder die Feinanteile zur Erhöhung der Ausbeute aufwendig abgetrennt werden müssen. Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, den vorliegenden Stand der Technik ganz oder teilweise zu verbessern, insbesondere Partikel mit einer relativ engen Korngrößenverteilung herzu-

stellen und die Ausbeute bei Nukleinsäurereinigung weiter zu erhöhen, oder/und Partikel für die Nukleinsäurereinigung bereitzustellen, die auch nach der Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes nur sehr geringe Tendenz zur Zusammenlagerung zeigen und genauso langsam im Schwerefeld sedimentieren, wie solche, die noch nie einem Magnetfeld ausgesetzt waren.

Gegenstand der Erfindung ist eine Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche, wobei mehr als 75 Gew.% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm haben.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind ein Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln enthaltend einen Kern ummantelt mit einer Gelschicht oder einer Glasschicht und ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Zubereitung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung und eine Zubereitung von Partikeln mit einem superparamagnetischen Kern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung und eine Zubereitung von Partikeln mit einem magnetischen, bevorzugt einem weichmagnetischen metallischem Kern.

Als Partikel bezeichnet der Fachmann feste Materialien mit einem geringen Durchmesser. Bevorzugt haben diese Partikel eine im wesentlichen kugelige Oberfläche. Hier sollen aber auch plättchenförmige und fadenförmige Teilchen in den unten angegebenen Dimensionen als Partikel verstanden werden. Um für die Reinigung von Nukleinsäuren besonders gut geeignet zu sein, ist es wünschenswert, daß das Partikel einen Kern (Pigmentanteil) aufweist, der bevorzugt magnetisch ist und der mit einer Glasschicht ummantelt ist. Solche Kerne enthalten bevorzugt Metalloxide, wie Aluminiumoxid, Eisenoxid, Chromoxid, Kupferoxid, Manganoxid, Bleioxid, Zinnoxid, Titanoxid, Zinkoxid und Zirkoniumoxid oder Metalle, wie Fe, Cr, Ni oder magnetische Legierungen. Die Zusammensetzung dieses Kerns ist für die Funktion der erfindungsgemäßen Partikel weniger wesentlich, da der Kern mit einer Glasoberfläche ummantelt wird, so daß der Kern nicht direkt mit der Probe, aus der die Nukleinsäure isoliert werden soll, in Berührung kommt. Solche Kerne sind

kommerziell erhältlich. Sofern der Kern Fe₃O₄ (Magnetit) oder Fe₂O₃ (Maghämít) oder Fe oder Cr oder Ni oder magnetische Legierungen enthält, sind diese Kerne magnetisch.

Als Materialien, die als weichmagnetisch bezeichnet werden, kommen Metalle auf Basis der reinen Elemente Fe, Ni, Cr und Legierungen davon, bevorzugt auf der Basis von Ni, in Frage. Beispiele solcher Legierungen sind unter der Bezeichnung Permalloy bekannt. Sie bestehen zu 70 bis 80 % aus Ni mit Zusätzen von Cr, Cu und Mo. Partikel aus magnetisch weichem Material ziehen einander in Abwesenheit eines externen Magnetfeldes nicht oder nur vernachlässigbar an.

Feinteilige Metallpulver sind sehr reaktiv. An Luft besteht die Gefahr der Selbstentzündung, sie gelten als pyrophor. Daher war es sehr überraschend, daß solch feinteilige Metallpartikel nach dem Sol-Gelverfahren mit einer Glasschicht überzogen werden konnten, ohne daß sich die magnetischen Eigenschaften wesentlich änderten. Besonders bevorzugt werden als Metallpulver Carbonyleisenpulver eingesetzt, wobei in H₂ reduzierte Typen magnetisch besonders bevorzugte Eigenschaften aufweisen. Bevorzugte Eigenschaften weisen auch Caronyleisenwhisker auf.

Metallpulver haben bevorzugt eine Korngröße von zwischen 10 nm und 100 µm, besonders bevorzugt von zwischen 200 nm und 8 µm.

Eine Glasoberfläche im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einem siliziumhaltigen amorphen Material. Das Glas enthält bevorzugt neben Siliziumoxid einen oder mehrere der folgenden Komponenten (in mol%):

B₂O₃ (0-30%), Al₂O₃ (0-20 %), CaO (0-20 %), BaO (0-10 %), K₂O (0-20 %), Na₂O (0-20 %), MgO (0-18 %), Pb₂O₃ (0-15 %), ZnO (0-6 %).

In geringerem Umfang von 0-5 % können auch eine Vielzahl anderer Oxide, wie z. B. Na₂O, Mn₂O₃, TiO₂, As₂O₃, Fe₂O₃, CuO, ZrO₂, CoO usw. enthalten sein. Als besonders wirksam haben sich Oberflächen einer Zusammensetzung von SiO₂, B₂O₃, Al₂O₃, CaO, K₂O, und ZnO erwiesen. Unter dem Gesichtspunkt der Ausbeute an Nukleinsäuren besonders bevorzugte Borsilikatgläser haben einen Zinkoxidgehalt von 2-6, bevorzugt von ca. 4 mol%. Besonders bevorzugt besteht die Glasschicht aus 68-79 mol% SiO₂, 15-

5 mol% B_2O_3 , 6-2.5 mol% Gesamtmenge an K_2O und Na_2O , 4-1 mol% CaO , 8-2 mol% Al_2O_3 , 6-2 mol% ZnO . Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Gläser, die durch den sogenannten Gel-Sol-Prozeß und anschließendes Trocknen und Verdichten der gebildeten Schicht gebildet werden. Dieser Prozeß ist in seinen Grundzügen bekannt und wurde z. B. in C.J. Brinker, G.W. Scherer "Sol Gel science – The physics and chemistry of Sol Gel Processing", Academic Press Inc. 1990 und Sol-Gel Optics, Processing and Applications Lisa C. Klein Ed. Kluwer Academic Publishers 1994, Seite 450 ff. sowie in DE-A-1941191, DE-A-3719339, DE-A-4117041 und DE-A-4217432 beschrieben. Im Gel-Sol-Prozeß werden Alkoxide von netzwerksbildenden Komponenten, z. B. SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 und ZnO zusammen mit Oxiden und Salzen anderer Komponenten, z. B. in alkoholischer Lösung, vorgelegt und hydrolysiert.

Durch die Zugabe von Wasser wird der Hydrolyseprozeß der Ausgangskomponenten in Gang gesetzt. Die Reaktion verläuft relativ rasch, da die Alkaliionen katalytisch auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Kieselsäureesters einwirken. Nach Ablauf der Gelbildung kann das entstehende Gel getrocknet und durch einen thermischen Prozeß zu einem Glas verdichtet werden.

Das Mengenverhältnis Sol/Pigment hat einen erheblichen Einfluß auf die Ausbeute an erfundungsgemäßen magnetischem Pigment. Grenzen sind dadurch gegeben, daß der Pigmentanteil so gering ist, daß eine noch pump- und sprühfähige Masse entsteht. Bei zu geringem Pigmentanteil wird der Feinanteil, z. B. von nicht-magnetischem Material zu groß und stört. Als im Hinblick auf die Pigmentausbeute zweckmäßige Mengenverhältnisse wurden 10 bis 45 g Pigment/100 ml Sol gefunden.

Die Aufschlämmung wird zur Entstehung eines Pulvers bevorzugt durch eine Düse versprüht und das Aerosol auf einer Fallstrecke getrocknet. Die Düse wird bevorzugt geheizt, um die Trocknung der Aufschlämmung zu beschleunigen. Abhängig von der Geometrie der Düse beträgt die Düsentemperatur bevorzugt ca. 120 bis 250 °C. Ein Kompromiß wird gefunden durch ausreichende Verdampfungsgeschwindigkeit, jedoch Vermeiden von Verspritzen.

Im Hinblick auf die Ausbeute ist die Verdichtungstemperatur möglichst hoch zu wählen. Ist sie jedoch zu hoch, verkleben die Partikel untereinander und es bilden sich Agglomerate, die herausgesiebt werden sollten. Ein Zusatz von Zink in der Schicht erhöht jedoch überraschenderweise den Schmelzpunkt, so daß eine höhere Verdichtungstemperatur (zwischen 710 und 800 °C) möglich ist. Die Nachbehandlung unter Luft führt bei zu hohen Temperaturen zu einem Verlust der magnetischen Eigenschaften, weshalb zu hohe Temperaturen vermieden werden sollten. Auch hier sind bei Zusatz von Zink andere Temperaturen möglich (bevorzugt zwischen 150 und 250 °C).

Es hat sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt, daß in den in WO 96/41811 beschriebenen Verfahren als magnetische Kerne auch solche eingesetzt werden können, die wesentlich kleiner sind. Insbesondere zeigte es sich, daß es möglich ist, nanoskalige Kerne, z.B. Magnetit, mit einer Kristallgröße kleiner 50 nm, bevorzugt kleiner 30 nm, einzusetzen. Die untere Grenze der Kerngröße ergibt sich aus der Handhabbarkeit der Kerne, besonders ihrer Neigung zur Bildung von Aggregaten. Bevorzugt sind die Kerne größer als 5 nm, besonders bevorzugt als 7 nm. Das magnetische Verhalten der nanoskaligen Kerne wird als superparamagnetisch bezeichnet. Die erhaltenen Partikel sedimentieren rasch unter Einwirkung eines externen Magnetfeldes. Nach Redispersion unterscheidet sich die Sedimentationsgeschwindigkeit im Schwerefeld nicht von der Sedimentationsgeschwindigkeit im Schwerefeld vor der Einwirkung des externen Magnetfeldes. Vorteilhaft dabei ist, daß längere Inkubationszeiten in Suspension möglich sind, ohne daß wieder aufgemischt und resuspendiert werden muß.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zubereitung wird eine Zubereitung von Kernpartikeln, in der mehr als 75 Gew.% der Kernpartikel eine Korngröße von zwischen etwas weniger als 0.5 und etwas weniger als 15 µm haben, in den Sol/Gel-Prozeß eingesetzt. Die Kernpartikel müssen um soviel kleiner sein als die glasummantelten Partikel, wie die Dicke der Glasschicht ausmacht. Die Glasschicht wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zwischen 5 nm und 1 µm dick sein, abhängig von den jeweils gewählten Umständen, wie Verhältnis Gel zu Kernpartikel. Im Durchschnitt dürfte die Glasschicht zwischen 0.2 und 0.3 µm dick sein.

Besonders bevorzugt ist eine Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche wobei mehr als 75 Gew.% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 2 und 15 µm haben. Besonders bevorzugt ist der Anteil der Partikel mit der bestimmten Korngröße größer als 90 Gew.%.

Besonders bevorzugt werden magnetische Kernpartikel eingesetzt. Die erfindungsgemäße Zubereitung hat den Vorteil, daß bevorzugt mehr als 95 Gew.% der Partikel mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm, bevorzugt zwischen 2 und 15 µm magnetisch sind. Dies bedeutet, daß gegenüber den bekannten Verfahren der Anteil von nicht-kernhaltigen Partikeln drastisch reduziert ist. Dies kann man daran erkennen, nur wenig nicht-magnetische Partikel enthalten sind. Dies führt dazu, daß es praktisch nicht mehr erforderlich ist, die gebildeten nicht-magnetischen Partikel von den magnetischen Partikeln abzutrennen, bevor die Zubereitung in Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren eingesetzt wird. Dies bedeutet eine Vereinfachung im Herstellprozeß.

Außerdem kann die erfindungsgemäße Zubereitung dadurch charakterisiert werden, daß bevorzugt weniger als 50 % der Partikel eine Korngröße von weniger als 2 µm haben. Dies hat zur Folge, daß der nicht-magnetische Feinanteil, der bei kleinen Korngrößen einen hohen relativen Anteil ausmacht, stark reduziert ist. Besonders bevorzugt haben weniger als 2 % der Partikel eine Korngröße von weniger als 0.5 µm.

Bevorzugt sind nicht mehr als 10 %, besonders bevorzugt zwischen 10 und 40 % der Partikel der Zubereitung Partikel mit einer Korngröße von mehr als 10 µm.

Die erfindungsgemäße Zubereitung kann neben den erfindungsgemäßen Partikeln noch weitere nicht-glashaltige Bestandteile enthalten, wie z. B. Puffersubstanzen oder ein Suspensionsmittel, z. B. Wasser oder alkoholische Lösungen von Wasser.

Die Glasschicht der Partikel der erfindungsgemäßen Zubereitung enthält bevorzugt einen Anteil von zwischen 2 und 6 mol%, besonders bevorzugt 4 mol% Zinkoxid. Dies kann dadurch erreicht werden, daß der Anteil von Zinkoxid an der festen Masse des Sols, verglichen mit den Anteilen der übrigen festen Komponenten, in diesem Größenordnungsbereich liegt. Der Anteil von Zinkoxid vergrößert sich mit Reduzierung des Anteils von

Boroxid, insbesondere bei längerem Erhitzen, da Boroxid unter den Herstellbedingungen schon flüchtig ist.

Partikel, die eine Glasschicht aufweisen, in der der Anteil von Zinkoxid zwischen 2 und 6 mol% liegt, haben sich als besonders wirksam bei der Reinigung von Nukleinsäuren herausgestellt. Die Ausbeute an Nukleinsäuren konnte, verglichen mit derselben Glasschicht ohne Zinkoxid, teilweise um 50 % erhöht werden.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln mit einem Kern ummantelt mit einer Gelschicht enthaltend weniger als 5 Gew.% kernlose Partikel enthaltend die Schritte Suspendieren von Kernpartikeln in einem Sol unter Verwendung einer Kernpartikelzubereitung und Sprührocknen der Suspension unter Gelbildung, wobei die Kernpartikelzubereitung zu 75 Gew.% aus Partikeln mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm, bevorzugt zwischen 2 und 15 µm besteht.

Zur Durchführung des Gel/Sol-Prozesses, welchen das erfindungsgemäß Herstellungsverfahren benutzt, wird auf die Beschreibung im Stand der Technik verwiesen. Der wesentliche Unterschied der Erfindung zu dem Vorgeschriebenen, ist der Einsatz einer bestimmten Kernpartikelzubereitung, durch welche eine Zubereitung mit weniger als 5 Gew.% kernloser Partikel hergestellt werden kann. Als besonders vorteilhaft hat sich ein Verfahren erwiesen, bei dem zunächst ein Sol aus Tetraalkylorthosilikaten, Alkylboraten, Aluminiumalkoholaten und Alkalialkoholaten in Ethanol hergestellt wird und diese Mischung mit Kalzium erhitzt wird. Anschließend wird die Mischung durch Zusatz von Wasser hydrolysiert. In das so gebildete Sol werden die Kernpartikel in Festform zugegeben und, bevorzugt mit Ultraschall, suspendiert. Anschließend wird die Suspension unter Gelbildung in einem Sprüh-Trocknungsverfahren, bei dem die Düse geheizt wird, und bei dem im wesentlichen Partikel entstehen, in denen 1 bis nur wenige Kernpartikel pro Partikel enthalten sind (bevorzugt enthalten weniger als 1 % der Partikel mehr als 10 Kernpartikel), versprüht. Das Sprühprodukt wird anschließend erhitzt, um das Gel zu einem Glas zu verdichten. Auch hier hat der Zusatz von Zinkoxid zum Gel einen erheblichen Vorteil. Die Verdichtung kann bei höheren Temperaturen als bei solchen ohne Zinkzusatz durchgeführt werden, da der Erweichungspunkt des entstehenden Glases höher liegt.

Dadurch lassen sich organische Restbestandteile aus den eingesetzten Materialien leichter austreiben.

Da nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Zubereitung mit einem sehr geringen Anteil von kernlosen Partikeln entsteht, ist im allgemeinen keine anschließende Fraktionierung nach kernlosen/kernhaltigen Partikeln mehr erforderlich.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren durch nicht-kovalente Bindung der Nukleinsäuren aus einer Probe an Partikel mit einer Glasoberfläche, Entfernen nicht-gebundener Probenbestandteile und Elution der gebundenen Nukleinsäuren von der Glasoberfläche, wobei eine erfindungsgemäße Zubereitung eingesetzt wird. Das Verfahren wird besonders einfach, wenn die Partikel magnetisch sind.

Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren mit Hilfe magnetischer Partikel mit einer Glasoberfläche sind in WO 96/41811 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird hier voll inhaltlich Bezug genommen. Als Proben für das erfindungsgemäße Reinigungsverfahren kommen insbesondere klinische Proben, wie Blut, Serum, Mundspülflüssigkeit, Urin, Zerebralflüssigkeit, Sputum, Stuhl, Plasma, Punktate oder Knochenmarksproben in Frage. Bevorzugtes Probenmaterial ist Serum. Zur Reinigung der Nukleinsäuren wird die Probe, erforderlichenfalls nach Lyse eventuell enthaltender zellulärer Strukturen und Verdau von strörenden Probenbestandteilen, mit der erfindungsgemäßen Zubereitung versetzt, z. B. in Form einer bestimmten Menge einer Suspension der Partikel. Nach einer Inkubationszeit, während derer die Nukleinsäuren an die Glasoberfläche sequenzspezifisch binden, wird die Flüssigkeit zusammen mit den nicht-gebundenen Probenbestandteilen entfernt und die Partikel gewünschtenfalls gewaschen, um Reste zu entfernen. Die noch daran gebundenen Nukleinsäuren werden durch Elution mit einer Flüssigkeit, in der sich die Nukleinsäuren gut lösen, von der Oberfläche entfernt. Die resultierende Flüssigkeit kann nun beliebig weiter bearbeitet werden, insbesondere in Amplifikationsverfahren eingesetzt werden, wie z. B. die PCR, da während des Reinigungsverfahrens die meisten Enzyminhibitoren abgetrennt wurden.

Sofern die Partikel magnetisch sind, ist die Entfernung der Flüssigkeit von Partikeln mit den Nukleinsäuren besonders einfach, da die Partikel mit Hilfe eines Magneten gesammelt

und festgehalten werden können, während die Flüssigkeit entfernt wird. Wenn die Partikel nicht magnetisch sind, können sie von der Flüssigkeit durch Filtration mit einem geeigneten Filter abgetrennt werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1**Sol zur Herstellung einer zinkfreien Schicht ($74 \text{ SiO}_2 \times 15\text{B}_2\text{O}_3 \times 4\text{K}_2\text{O} \times 2\text{CaO} \times 5\text{Al}_2\text{O}_3$)**

In einen 5 Liter Rundkolben werden 1750 ml Tetraethylorthosilikat (Hersteller: Wacker, Burghausen) vorgelegt und bei Raumtemperatur unter Röhren (500 U/min) zügig zugegeben:

541 ml Triethylborat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

250 ml Kaliummethanolat (25%ig in Methanol (Hersteller: Fluka, Deisenhofen))

261 g Aluminium-sec.-Butylat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

292 ml Ethanol und

8,49 g Calcium (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

Die Mischung wird anschließend unter Röhren erhitzt bis zum starken Rückfluß. Über 30 Minuten wird eine Mischung von insgesamt 583 ml Ethanol und 233 ml Wasser zuge tropft. Nach Abkühlen auf < 50 °C wird das Sol umgefüllt in einen offenen Behälter und 1200 g Pigment IRIODIN 600 Black Mica (Hersteller: Merck, Darmstadt) dazugegeben.

Das Sol wird nach vollständiger Pigmentzugabe noch 1 Minute bei 500 U/min gerührt und anschließend 5 Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach der Ultraschallbehandlung wird das Sol-Pigment-Gemisch mit einem Dissolverrührer bei ca. 500 U/min gerührt, bis die gesamte Menge aufgebraucht ist.

Beispiel 2**Herstellung von glasbeschichtetem Pigment (MGP)**

Versprührt wird in einem Sprühturm der Fa. Nubilosa, Konstanz, mit einem Durchmesser von 0,75 m, einer Höhe von 2,5 m und einer Verdunstungsleistung (bezogen auf Wasser) von 1 – 3 Liter/Stunde. Die Lufteinlaßtemperatur beträgt 270 °C, die Auslaßtemperatur ca. 130 °C. Der Durchsatz der Luft ist 7,2 m³/min. Zum Sprühen wird eine Zweistoffdüse verwendet mit einem Sprühdruck von 2 bar. Die Förderleistung der verwendeten Kugelventil- membranpumpe beträgt 60 g Sol/min.

Das Sprühprodukt wird in einem Zyklon abgefangen, an Luft bei 250 °C 1 Stunde vorverdichtet und anschließend in einem Stickstoffofen mit einer Heizrate von 1 K/min auf eine Temperatur von 675 °C gebracht, 1 Stunde dort gehalten und abgekühlt auf 300 °C. Bei 300 °C wird Sauerstoff zudosiert, 1 Stunde gehalten, dann abgekühlt auf Raumtemperatur. Nach dem Abkühlen erfolgt eine Siebung mit einem Sieb mit einer Maschenweite von 50 µm zur Entfernung von eventuell vorhandenen Aggregaten. Damit ist die Herstellung abgeschlossen.

Beispiel 3

Sol zur Herstellung einer zinkhaltigen Schicht (70,67 SiO₂ x 14,33 B₂O₃ x 4 K₂O x 2 CaO x 5 Al₂O₃ x 4 ZnO)

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wird ein zinkhaltiges Sol bereitet. Dazu werden folgende Edukte eingewogen und analog behandelt:

1258 ml Tetraethylorthosilikat (Hersteller: Wacker, Burghausen)

387 ml Triethylborat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

188 ml Kaliummethanolat 25%ig in Methanol (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

196 g Aluminium-sec.-Butylat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

1285 ml Ethanol

6,39 g Calcium (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

58,5 g Zinkacetat dehydriertes Dihydrat (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

Nach dem Kochen unter Rückfluß werden 178 ml H₂O zusammen mit 444 ml Ethanol binnen 30 Minuten zugetropft. Nach dem Abkühlen werden 1200 g Pigment zugesetzt. Ansonsten siehe Beispiel 1.

Beispiel 4

Herstellung von zinkhaltigen glasbeschichtetem Pigment

Das pigmenthaltige Sol aus Beispiel 3 wird analog Beispiel 2 verarbeitet. Die Verdichtungstemperatur beträgt jedoch 750 °C.

Beispiel 5**Herstellung von zinkhaltigen glasbeschichtetem Pigment mit modifizierter Nachbehandlung (MGP, Magnetische Glas-Partikel)**

Das pigmenthaltige Sol aus Beispiel 3 wird analog Beispiel 2 verarbeitet. Die Verdichtungstemperatur beträgt jedoch 750 °C und die Temperatur bei der Behandlung in Sauerstoff beträgt 200 °C.

Beispiel 6**Ermittlung der Ausbeute von DNA bzw. RNA mit radioaktivem ^{32}P**

Zum direkten Nachweis von gebundener bzw. nicht-gebundener DNA bzw. RNA werden ^{32}P -markierter HIVgag RNA Standard mit 1,4 kb bzw. ^{32}P -markierter Lambdaamplikons mit 3 kb eingesetzt. Als Probe dient Negativplasma (human) enthaltend jeweils 10^9 Kopien.

Durchführung der Probenvorbereitung

In ein 2 ml Eppendorf-Gefäß werden 500 µl Negativplasma mit 10^9 Kopien ^{32}P gelabelte Lambdaamplikons gegeben. Dazu werden 480 µl Bindepuffer/Proteinase K-Lösung (5 : 1) zupipettiert, gevortext und bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 400 µl isopropanolische MGP-Suspension mit einem Gesamtinhalt von 3 mg MGP zupipettiert. Unmittelbar darauf wird durch Vortexen gemischt. Die Probe wird dann für 15 Minuten auf einem Mischer, z. B. Thermomischer 5436 von Eppendorf, inkubiert.

Die MGP werden durch Überführung der Probe in einen Magnetseparator konzentriert. Nach 1 Minute wird der Überstand vollständig abpipettiert.

0,5 ml Waschpuffer werden zu den MGPs pipettiert. Die Probe wird gevortext und dann in den Magnetseparator überführt. Der Überstand wird nach 1 Minute abpipettiert. Die Waschprozedur wird noch 2 x wiederholt.

Zu den MGP werden 200 ml Elutionspuffer zugesetzt. Bei 80 °C wird 10 Minuten auf einem Thermomischer bei 1400 RPM inkubiert. Die Probe wird in den Magnetseparatror überführt und nach 1 Minute wird das gesamte Eluat abgenommen. Das Eluat wird dann in ein neues Gefäß überführt und in einem Szintillationszähler vermessen.

Aus dem Verhältnis der Radioaktivität des Eluates zu der Radioaktivität der Probe vor der Reinigungsprozedur kann die Ausbeute ermittelt werden.

Ergebnisse mit MGPs unterschiedlicher Beschichtung:

	Ausbeute DNA	Ausbeute RNA
MGP gemäß Beispiel 2 (ohne Zink)	44 %	44 %
MGP gemäß Beispiel 4 (mit Zink)	62 %	59 %
MGP gemäß Beispiel 6 (mit Zink, modifizierte Nachbehandlung)	66 %	70 %

Beispiel 7

Black Mica (BM) als Pigmentbasis (Referenzbeispiel)

Gemäß Beispiel 1 wird eine Charge gefertig, bei der das Pigment Black Mica (BM) ist.

Beispiel 8

Microna Matte Black (MMB) als Pigmentbasis

Gemäß Beispiel 1 wird eine Charge gefertigt, bei der das Pigment MMB (Microna Matte Black (Hersteller: Merck, Darmstadt)) ist.

Beispiel 9**Signalhöhe nach Amplifikation bei Probenvorbereitung mit MGP auf verschiedener Pigmentbasis**

MGP gemäß den Beispielen 7 und 8 wird bei einer Probenvorbereitung eingesetzt. Als Probe dient Humanplasma mit 100 Kopien/ml HCV-Viren. Das Eluat der Probenvorbereitung wird einer Amplifikation unterworfen und das Amplifikationsergebnis mit einem Elektrolumineszenzverfahren detektiert. In einem weiteren Versuch war die Probe Humanplasma mit 600 Kopien/ml HBV-Viren.

	HCV ECL Counts	HBV ECL Counts
MGP gemäß Beispiel 7 (BM)	97000	25000
MGP gemäß Beispiel 8 (MMB)	127000	43000

Beispiel 10**Carbonyleisenpulver HQ als Pigment**

Ein zinkhaltiges Sol wird in Analogie zu Beispiel 3 hergestellt, jedoch nur 240 g Sol.

Nach dem Abkühlen werden 71 g Carbonyleisenpulver HQ (BASF, Ludwigshafen), mit der Korngrößenverteilung: 10% < 0,5 µm, 50% < 1,1 µm, 90% < 2,2 µm, zugesetzt, 1 Minute bei 500 U/min gerührt und anschließend 5 Minuten mit Ultraschall behandelt. Das Sol wird in einem Sprühtrockner (Büche 190, Mini Spray Dryer) versprüht. Die Düsentemperatur des Sprühtrockners beträgt 140 °C.

Das erhaltene Pulver wird bei 150 °C an Luft ausgeheizt. Die Aufheizgeschwindigkeit beträgt 1 K/min, die Haltezeit 1 Stunde. Anschließend wird die Luft im Ofen durch N₂ ersetzt, mehrfach gespült und mit 1 K/min auf 700 °C erhitzt, 1 Stunde gehalten, auf 200 °C abgekühlt mit 1 K/min. Bei 200 °C wird N₂ durch Luft ersetzt und 1 Stunde gehalten. Danach wird abgekühlt auf Raumtemperatur. Eventuell entstandene Aggregate werden mit einem 50 µm Sieb ausgesiebt.

Die Ausbeute beträgt 62,4 g. Siebverluste sind vernachlässigbar: Aggregate treten nicht auf.

Beispiel 11

Ermitteln der Bindung von RNA

Gemäß Beispiel 6 wird ^{32}P -markierter HIVgag Standard mit 1,4 Kb an die Partikel gemäß Beispiel 10 gebunden. Die radioaktive Messung ergibt eine Bindung > 80 %.

Beispiel 12

Vergleich der Sedimentationsgeschwindigkeiten

Je 3 mg Partikel gemäß Beispiel 10 werden in zwei Eppendorf-Gefäße mit einem Volumen von 2 ml überführt und mit je 1,5 ml H₂O suspendiert.

Die Partikel in Gefäß 1 werden mit einem Magneten an die Gefäßwand gezogen und anschließend durch Schütteln resuspendiert. Gleichzeitig werden die Partikel in Gefäß 2 aufgeschüttelt.

Die Sedimentation im Schwerefeld wird visuell beobachtet. Es ergeben sich keine Unterschiede.

Patentansprüche

1. Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche, wobei mehr als 75 Gew.% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm haben.
2. Zubereitung gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß mehr als 95 Gew.% der Partikel mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm magnetisch sind.
3. Zubereitung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß weniger als die Hälfte der Partikel eine Korngröße von weniger als 2 µm haben.
4. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß weniger als 2 % der Partikel eine Korngröße von weniger als 0.5 µm haben.
5. Zubereitung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel einen magnetischen Kern aufweisen, der mit Glas ummantelt ist.
6. Zubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nicht mehr als 10 % dieser Partikel Partikel mit einer Korngröße von mehr als 10 µm sind.
7. Zubereitung gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen Glasmantel aufweisen, der einen Anteil von zwischen 2 und 6 mol% Zinkoxid enthält.
8. Zubereitung gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, enthaltend mindestens einen Kern aus einem magnetischen Metall.
9. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln mit einem Kern ummantelt mit einer Gelschicht enthaltend weniger als 5 Gew.% kernlose Partikel, enthaltend die Schritte
 - Suspendieren von Kernpartikeln in einem Sol unter Verwendung einer Kernpartikelzubereitung
 - Sprühtrocknen der Suspension unter Gelbildung

dadurch gekennzeichnet, daß die Kernpartikelzubereitung zu 75 Gew.% aus Partikeln mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm besteht.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Sol Zink enthält.
11. Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren durch nicht-kovalente Bindung der Nukleinsäuren aus einer Probe an Partikel mit einer Glasoberfläche, Entfernen nicht-gebundener Probenbestandteile und Elution der gebundenen Nukleinsäuren von der Glasoberfläche, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einer Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 oder 15 bis 16 in Kontakt gebracht wird.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel magnetisch sind und bei Entfernung der Probenbestandteile durch einen Magneten festgehalten werden.
13. Verwendung von Zinkoxid in nach dem Sol/Gel-Prozeß erzeugten Glasschichten zur Erhöhung der Bindefähigkeit der Glasoberfläche für Nukleinsäuren.
14. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln mit einem Kern ummantelt mit einer Glasschicht enthaltend weniger als 5 Gew.% kernlose Partikel, enthaltend die Schritte
 - Suspendieren von Kernpartikeln in einem Sol unter Verwendung einer Kernpartikelzubereitung
 - Sprühtrocknen der Suspension unter Gelbildung
 - Verdichtung des Gels zum Glasdadurch gekennzeichnet, daß die Kernpartikelzubereitung zu 75 Gew.% aus Partikeln mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm besteht.
15. Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche, wobei die Partikel mindestens einen Kern aus einem magnetischen Metall haben.

16. Zubereitung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Kerne eine Korngröße von zwischen 0,01 µm und 100 µm, besonders bevorzugt zwischen 0,2 µm und 8 µm haben

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 99/08996

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/10 H01F1/00 H01F1/11 C09C3/06 C04B35/628

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N H01F C09C C04B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 195 37 985 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17 April 1997 (1997-04-17) page 2, line 47 -page 3, line 12 page 4, line 9 - line 63 claims 1-13	1-8, 11-13, 15,16
X	DE 195 20 964 A (INSTITUT FÜR NEUE MATERIALIEN GEMEINNÜTZIGE GMBH) 12 December 1996 (1996-12-12) column 1, line 34 -column 3, line 35 claims 1-11; example 8	1-10, 14-16
X	WO 98 31840 A (PROMEGA CORP.) 23 July 1998 (1998-07-23) the whole document	15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

25 February 2000

Date of mailing of the International search report

06/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5018 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Luethe, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/08996

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19537985 A	17-04-1997	AU	707115 B	01-07-1999
		AU	6300796 A	09-01-1997
		CA	2223821 A	27-12-1996
		CN	1192217 A	02-09-1998
		WO	9641811 A	27-12-1996
		EP	0837871 A	29-04-1998
		JP	11509364 T	17-08-1999
		NO	975772 A	06-02-1998
		NZ	311648 A	30-08-1999
DE 19520964 A	12-12-1996	AT	179200 T	15-05-1999
		AU	5818296 A	09-01-1997
		CZ	9700404 A	16-07-1997
		DE	59601722 D	27-05-1999
		WO	9641840 A	27-12-1996
		EP	0830429 A	25-03-1998
		EP	0777633 A	11-06-1997
		ES	2130829 T	01-07-1999
		WO	9641773 A	27-12-1996
		JP	11507412 T	29-06-1999
		JP	10504013 T	14-04-1998
		PL	318504 A	23-06-1997
WO 9831840 A	23-07-1998	AU	6647598 A	07-08-1998
		CA	2249393 A	23-07-1998
		EP	0895546 A	10-02-1999
		JP	11509742 T	31-08-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. neues Aktenzeichen

PCT/EP 99/08996

A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/10 H01F1/00 H01F1/11 C09C3/06 C04B35/628

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBiete

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N H01F C09C C04B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 195 37 985 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. April 1997 (1997-04-17) Seite 2, Zeile 47 -Seite 3, Zeile 12 Seite 4, Zeile 9 - Zeile 63 Ansprüche 1-13	1-8, 11-13, 15, 16
X	DE 195 20 964 A (INSTITUT FÜR NEUE MATERIALIEN GEMEINNÜTZIGE GMBH) 12. Dezember 1996 (1996-12-12) Spalte 1, Zeile 34 -Spalte 3, Zeile 35 Ansprüche 1-11; Beispiel 8	1-10, 14-16
X	WO 98 31840 A (PROMEGA CORP.) 23. Juli 1998 (1998-07-23) das ganze Dokument	15

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

 Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipiell oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"%" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendetermin des Internationalen Rechercheberichts

25. Februar 2000

06/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luethe, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08996

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19537985 A	17-04-1997	AU 707115 B AU 6300796 A CA 2223821 A CN 1192217 A WO 9641811 A EP 0837871 A JP 11509364 T NO 975772 A NZ 311648 A	01-07-1999 09-01-1997 27-12-1996 02-09-1998 27-12-1996 29-04-1998 17-08-1999 06-02-1998 30-08-1999
DE 19520964 A	12-12-1996	AT 179200 T AU 5818296 A CZ 9700404 A DE 59601722 D WO 9641840 A EP 0830429 A EP 0777633 A ES 2130829 T WO 9641773 A JP 11507412 T JP 10504013 T PL 318504 A	15-05-1999 09-01-1997 16-07-1997 27-05-1999 27-12-1996 25-03-1998 11-06-1997 01-07-1999 27-12-1996 29-06-1999 14-04-1998 23-06-1997
WO 9831840 A	23-07-1998	AU 6647598 A CA 2249393 A EP 0895546 A JP 11509742 T	07-08-1998 23-07-1998 10-02-1999 31-08-1999